



MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGIA



REC'D 20 MAR 2003

WIPO PCT

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 200200257, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 4 de Febrero de 2002.

Madrid, 25 de febrero de 2003

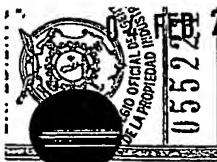
El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.

P.D.

M. MADRUGA

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY



02

FEB

1992

ERIO
NCIA
JOLOGIAla Española
de Patentes y Marcas

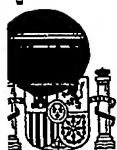
INSTANCIA DE SOLICITUD

NÚMERO DE SOLICITUD

P200200257

(1) MODALIDAD: <input checked="" type="checkbox"/> .PATENTE DE INVENCION <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD		FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M. 02 FEB -4 11:32						
(2) TIPO DE SOLICITUD:		(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN: MODALIDAD N.º SOLICITUD FECHA SOLICITUD / /		FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.				
		(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN: CÓDIGO MADRID 1218						
(5) SOLICITANTES: APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL ANTIBIOTICOS, S.A.U.		NOMBRE		NACIONALIDAD ESPAÑOLA	CÓDIGO PAÍS ES	DNI/CIF	CNAE	PYME
(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE: DOMICILIO LOCALIDAD PROVINCIA PAÍS RESIDENCIA NACIONALIDAD		TELÉFONO FAX CORREO ELECTRÓNICO CÓDIGO POSTAL CÓDIGO PAÍS CÓDIGO PAÍS						
Avda. de Antibióticos, 59/61, Apartado de correos 255 24080 León		JUAN LUIS ENRIQUE BRUNO ANA TERESA		ESPAÑOLA " " "	ES ES ES ES	CÓDIGO PAÍS ES ES ES ES		
(7) INVENTORES: 1) DE LA FUENTE MORENO 2) PEIRO CEZON 3) DIEZ GARCIA 4) MARCOS RODRIGUEZ								
(8) <input type="checkbox"/> EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR <input checked="" type="checkbox"/> EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR		(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO: <input checked="" type="checkbox"/> INVENC. LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESIÓN						
(10) TÍTULO DE LA INVENCION: "PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE ASTAXANTINA MEDIANTE LA FERMENTACION DE CEPAS SELECCIONADAS DE XANTHOPHYLLOMYCES DENDRORHOUS"								
(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA: <input checked="" type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO								
(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR FECHA								
(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD: PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	NÚMERO		FECHA			
(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES <input type="checkbox"/>								
(15) AGENTE/REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLÉNESE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES) D. IGNACIO DIEZ DE RIVERA ELZABURU 891 (5) (COLEGIADO N.º 585) Miguel Angel, nº 21, 28010 Madrid, España								
(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:		<input checked="" type="checkbox"/> DESCRIPCIÓN N.º DE PÁGINAS: 39 <input checked="" type="checkbox"/> N.º DE REIVINDICACIONES: 26 <input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS, N.º DE PÁGINAS: 9 <input type="checkbox"/> LISTA DE SECUENCIAS N.º DE PÁGINAS: <input type="checkbox"/> RESUMEN <input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD			<input checked="" type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN <input checked="" type="checkbox"/> JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD <input checked="" type="checkbox"/> HOJA DE INFORMACION COMPLEMENTARIA <input type="checkbox"/> PRUEBAS DE LOS DIBUJOS <input type="checkbox"/> CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN <input type="checkbox"/> OTROS:			
					FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE Ignacio Diez de Rivera Elzaburu por mi compañero (VER COMUNICACIÓN AL DORSO)			
					FIRMA DEL FUNCIONARIO			
NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN: Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.								

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARQUADOS EN ROJO



PATENTE
RESUMEN Y GRÁFICO

'02 FEB -4

P20

NÚMERO DE SOLICITUD

0200257

FECHA DE PRESENTACIÓN

04 de Febrero de 2002
11:32

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA MEDIANTE LA FERMENTACIÓN DE CEPAS SELECCIONADAS DE *XANTHOPHYLLOMYCES DENDRORHOUS*. La presente invención describe procedimientos para (i) la obtención de cepas de *X. dendrorhous* superproductoras de astaxantina y (ii) la utilización de las cepas anteriormente citadas en condiciones mejoradas de fermentación. Los métodos de selección de cepas utilizados se basan en: (i) resistencia a inhibidores de la síntesis de esteroides, a inhibidores de la respiración y a compuestos que inducen la formación de radicales libres, (ii) intensidad de color de la colonia y producción de carotenoides en medio sólido, (iii) producción de astaxantina en oscuridad, (iv) producción de astaxantina en condiciones de elevada temperatura y (v) producción de astaxantina con fuentes de carbono alternativas a glucosa. Estos métodos permiten seleccionar eficazmente mutantes de *X. dendrorhous* con producciones de astaxantina superiores a la cepa parental y baja acumulación de otros carotenoides. El cultivo en medio líquido de *X. dendrorhous* permite obtener una biomasa que puede utilizarse directamente en alimentación humana y animal.

GRÁFICO

HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

NÚMERO DE SOLICITUD

P 200200257

FECHA DE PRESENTACIÓN

04 de Febrero de 2002

PATENTE DE INVENCIÓN

MODELO DE UTILIDAD

(5) SOLICITANTES:	APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL	NOMBRE	NACIONALIDAD	CÓDIGO PAÍS	DNI/CIF	CNAE	PYME

(7) INVENTORES:	APELLIDOS	NOMBRE	NACIONALIDAD
	5) SCHLEISSNER SANCHEZ 6) RODRIGUEZ SAIZ 7) RODRIGUEZ OTERO 8) CABRI 9) BARREDO FUENTE	CARMEN MARTA CARMELITA WALTER JOSE LUIS	española " " " italiana española

(12) EXPOSICIONES OFICIALES:	LUGAR	FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA
PAÍS DE ORIGEN			



(12)

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

(21) NÚMERO DE SOLICITUD

P200200257

(31) NÚMERO	DATOS DE PRIORIDAD		(33) PAÍS
	(32) FECHA		
(22) FECHA DE PRESENTACIÓN 04 Febrero 2002			
(23) PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA			

(71) SOLICITANTE (S)

ANTIBIOTICOS, S.A.U.

DOMICILIO Avda. de Antibióticos, 59/61 NACIONALIDAD española
Apartado de Correos 255, León 24080, España

(72) INVENTOR (ES) JUAN LUIS DE LA FUENTE MORENO, ENRIQUE PEIRO CEZON, BRUNO DIEZ GARCIA,
ANA TERESA MARCOS RODRIGUEZ, CARMEN SCHLEISSNER SANCHEZ, MARTA RODRIGUEZ SAIZ, CARME
LITA RODRIGUEZ OTERO, WALTER CABRI y JOSE LUIS BARREDO FUENTE

(51) Int. Cl.

GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

(54) TÍTULO DE LA INVENCIÓN

"PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE ASTAXANTINA MEDIANTE LA FERMENTACION DE CEPAS SELECCIONADAS DE XANTHOPHYLLOMYCES DENDRORHOUS"

(57) RESUMEN

PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA MEDIANTE LA FERMENTACIÓN DE CEPAS SELECCIONADAS DE *XANTHOPHYLLOMYCES DENDRORHOUS*. La presente invención describe procedimientos para (i) la obtención de cepas de *X. dendrorhous* superproductoras de astaxantina y (ii) la utilización de las cepas anteriormente citadas en condiciones mejoradas de fermentación. Los métodos de selección de cepas utilizados se basan en: (i) resistencia a inhibidores de la síntesis de esteroides, a inhibidores de la respiración y a compuestos que inducen la formación de radicales libres, (ii) intensidad de color de la colonia y producción de carotenoides en medio sólido, (iii) producción de astaxantina en oscuridad, (iv) producción de astaxantina en condiciones de elevada temperatura y (v) producción de astaxantina con fuentes de carbono alternativas a glucosa. Estos métodos permiten seleccionar eficazmente mutantes de *X. dendrorhous* con producciones de astaxantina superiores a la cepa parental y baja acumulación de otros carotenoides. El cultivo en medio líquido de *X. dendrorhous* permite obtener una biomasa que puede utilizarse directamente en alimentación humana y animal.

Procedimiento de producción de astaxantina mediante la fermentación de cepas seleccionadas de *Xanthophyllomyces dendrorhous*.

5 **Campo de la invención**

La presente invención describe procedimientos para (i) la selección de cepas de *Xanthophyllomyces dendrorhous* superproductoras de astaxantina y (ii) la utilización de las cepas anteriormente citadas en condiciones mejoradas de 10 fermentación.

Estado de la técnica

Los carotenoides son pigmentos de naturaleza isoprenoide sintetizados por ciertas bacterias, hongos y 15 organismos fotosintéticos. Debido a sus efectos beneficiosos para la salud y a sus atractivos colores, los carotenoides poseen una gran importancia comercial como colorantes y aditivos alimentarios. Los carotenoides son compuestos poliénicos de 40 o 50 átomos de carbono formados 20 por 8-10 unidades de isopreno (C5). Poseen un máximo de absorción entre 400 y 500 nm, lo cual les proporciona su coloración característica entre amarillo y rojo. Los carotenoides con la cadena hidrocarbonada no sustituida (licopeno, β -caroteno) se denominan carotenos. Los derivados oxigenados se denominan xantofilas. Entre estas últimas 25 se incluyen alcoholes (luteína y zeaxantina), epóxidos (violaxantina), ésteres (esferoideno), cetonas (equinenoa, cantaxantina, astaxantina) y ácidos (torularodina). La presencia del grupo cromóforo en la estructura de los 30 carotenoides tiene una importante función biológica como agente fotoprotector y antioxidante. Los carotenoides protegen los tejidos vulnerables contra los efectos de los singletes de oxígeno y los radicales libres. De este modo, el intermediario biosintético de astaxantina 3-hidroxi-

3',4'-didehidro- β,ψ -caroten-4-one (HDCO) desempeña una importante función como secuestrador de radicales libres, además de proporcionar una pigmentación rojiza muy agradable. Entre las numerosas funciones biológicas que desempeñan los carotenoides destacan como anticancerígenos, 5 potenciadores del sistema inmunitario, preventivos de enfermedades degenerativas del sistema nervioso central (Alzheimer, enfermedades relacionadas con la visión, etc.), antiinflamatorios, antiestrés, fotoprotectores, etc. La 10 astaxantina es un cetocarotenoide (xantofila) ampliamente distribuido en la naturaleza cuya molécula posee once dobles enlaces conjugados. Es producida por bacterias (Agrobacterium aurantiacum, Rhodococcus maris, etc.), 15 hongos (X. dendrorhous), algas (Haematococcus pluvialis) y plantas superiores. En general todas las partes verdes de los vegetales poseen astaxantina enmascarada por clorofila, lo cual, junto con otros carotenoides, les confiere la típica coloración otoñal. Asimismo se encuentra en las 20 flores de *Adonis aestivalis*), aves (flamenco e ibis escarlata), peces (salmónidos) e invertebrados marinos (camarón, cangrejo, langosta, etc.) y cumple importantes funciones para la protección y supervivencia de estos seres vivos.

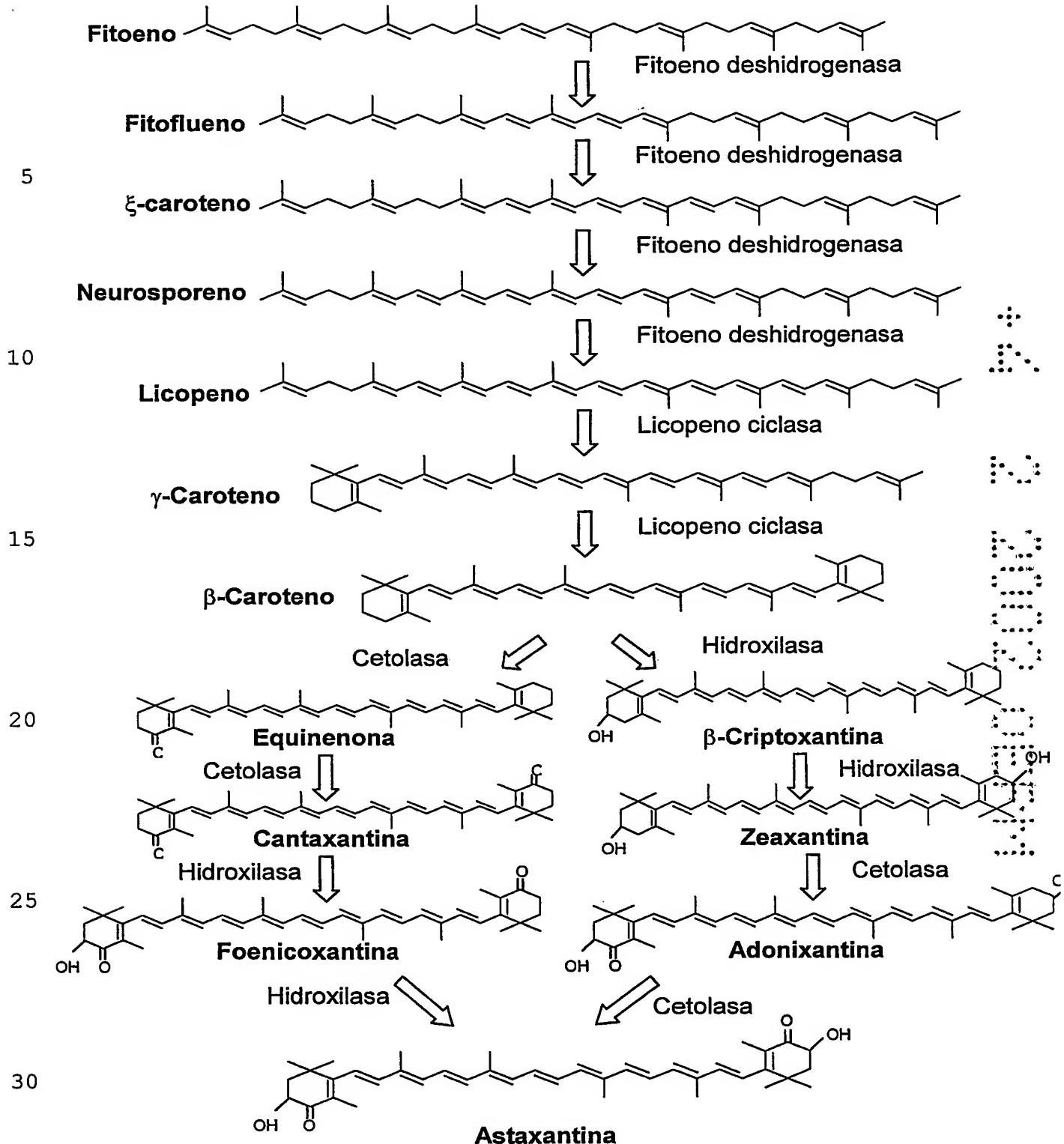
La producción de carotenoides por biosíntesis 25 microbiana es un ejemplo clásico de competencia entre los procesos químicos y los biológicos. Los procesos biotecnológicos muestran, entre otras, la ventaja de permitir obtener de forma simple los carotenoides de estructura más compleja, así como los isómeros 30 conformacionales que sólo existen de forma natural. Los procesos biotecnológicos industriales para la producción de astaxantina, competitivos con la síntesis química, están basados en la utilización del alga *H. pluvialis* y de la levadura *X. dendrorhous*. La producción industrial de

astaxantina con *H. pluvialis* supone la necesidad de amplias superficies marinas para su cultivo, la existencia de contaminaciones y la dificultad de control de ciertos factores ambientales. Por ello, cuando en 1976 se describió 5 por primera vez *X. dendrorhous* (Phaff H.F. et al. 1972. Proc. IV IFS: Ferment. Technol. Today 759-774) y se demostró su capacidad para producir astaxantina y otros carotenoides (Johnson et al. 1978. Appl. Environ. Microbiol. 35: 1155-1159), así como su eficacia en la 10 pigmentación de salmonidos, huevos de aves, etc., la levadura adquirió rápidamente un creciente interés industrial.

La biomasa de *X. dendrorhous* rica en astaxantina puede 15 utilizarse como suplemento alimenticio para colorear la carne de salmonidos. Los salmones adquieren su coloración típica en su medio natural debido a que en su alimentación incluyen microorganismos y crustáceos que contienen astaxantina. Los peces cultivados en cautividad presentaban originalmente una coloración blanquecina de la carne y la 20 piel, debido a la ausencia de astaxantina en su alimentación. La astaxantina, además de conferir color y sabor, desempeña un papel importante en la función reproductora y en el desarrollo general del pez. Actualmente la mayor parte de la astaxantina se obtiene por 25 síntesis química, ya que su extracción a partir de caparazones de crustáceos no resulta económicamente rentable. No obstante, debido a la creciente sensibilidad del consumidor a los aditivos químicos y a los productos sintéticos, se está potenciando la utilización de *X. dendrorhous* y *H. pluvialis* como fuentes naturales de 30 astaxantina.

La ruta biosintética de astaxantina (ver esquema 1) ha sido descrita en una serie de organismos como *X. dendrorhous*, *Erwinia uredovora* y *Agrobacterium aurantiacum*

(Ducrey Sanpietro L.M. 1998. Yeast 14: 1007-1016; Misawa N. et al. 1995. J. Bacteriol. 177: 6575-6584; Fraser P.D. et al. 1997. J. Biol. Chem. 272: 6128-6135). Para dicha biosíntesis son necesarias al menos cinco actividades enzimáticas: (i) fitoeno sintasa, la cual une dos moléculas de geranilgeranil pirofosfato generando fitoeno, (ii) fitoeno deshidrogenasa, la cual introduce cuatro dobles enlaces en la molécula de fitoeno para sintetizar licopeno, (iii) licopeno ciclasa, la cual, utilizando licopeno como sustrato, se encarga de formar los anillos situados en ambos extremos de la molécula de β -caroteno, (iv) β -caroteno cetolasa, la cual cataliza la introducción de un grupo ceto en cada uno de los anillos situados en ambos extremos de la molécula de β -caroteno y (v) β -caroteno hidroxilasa, la cual realiza la hidroxilación de cada uno de los anillos situados en ambos extremos de la molécula de β -caroteno. Estas dos últimas actividades enzimáticas participan en la biosíntesis de una serie de precursores (equinenona, cantaxantina, foenicoxantina, β -criptoxantina, zeaxantina, adonixantina) de astaxantina (esquema 1). Las actividades enzimáticas β -caroteno cetolasa y β -caroteno hidroxilasa (así como los genes que las codifican) han sido caracterizadas en una serie de organismos como *E. uredovora*, *A. aurantiacum*, *Arabidopsis thaliana*, etc. y en todos los casos se ha descrito la existencia de dos proteínas independientes. Sin embargo, en *X. dendrorhous* ha sido descrita la existencia de una sola enzima denominada astaxantina sintetasa, la cual cataliza la conversión de β -caroteno en astaxantina (Tatsuo H. et al. 2000. EP1035206).



Esquema 1. Ruta biosintética simplificada de astaxantina en *X. dendrorhous*.

El creciente interés comercial de *X. dendrorhous* para la producción de astaxantina ha fomentado la aplicación de técnicas de tipaje molecular en este microorganismo (Adrio J.L. et al. 1995. Curr. Genet. 27:447-450). De esta forma, 5 es posible establecer diferencias entre las cepas seleccionadas en los programas de mejora. Asimismo, estas técnicas pueden ser utilizadas para controlar la calidad de la biomasa obtenida, ya que posibilitan determinar la estabilidad genética de la cepa durante la fermentación y 10 la presencia de contaminación con otros microorganismos.

La utilización de sondas de ADN está indicada para el análisis de microorganismos para los que existen sondas adecuadas y no son diferenciables con facilidad mediante 15 métodos bioquímicos. La amplificación de ADN es el método utilizado para la detección directa debido a su sensibilidad y rapidez. En la mayor parte de los casos, la 20 detección del fragmento de ADN amplificado se realiza simplemente mediante tinción del gel de agarosa con bromuro de etidio. Entre las técnicas de tipaje molecular basadas en la electroforesis de ADN se encuentran las siguientes: 25 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), ribotipado (hibridación con sondas de rRNA), PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), OFAGE (Ortogonal Field Gel Electrophoresis), FIGE (Field Inversion Gel Electrophoresis), CHEF (Clamped Homogeneous Electrical Field), etc. Por otra parte existen una serie de procedimientos de tipaje molecular basados en la amplificación de ADN: PCR (Polymerase Chain Reaction), PCR-RFLP, 30 REP (Repetitive Extragenic Palindromic), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), etc. La técnica electroforética RFLP ha sido muy utilizada para la detección de variaciones en el ADN de diferentes

organismos. Sin embargo, el descubrimiento de la técnica de PCR ha supuesto que métodos como el RAPD supongan alternativas rápidas y eficaces a los métodos electroforeticos. Adicionalmente, el RAPD posee la ventaja de no precisar la utilización de isótopos radiactivos y requerir menores cantidades de ADN para el análisis. Esta técnica se basa en la utilización como cebador de un oligonucleótido de pequeña longitud. Dicho oligonucleótido puede unirse a diferentes regiones del ADN genómico utilizado como molde, posibilitando la amplificación de ciertas secuencias de ADN. Los cebadores utilizados en RAPD poseen una secuencia arbitraria, normalmente con un contenido en G+C superior al 50% y ausencia de secuencias internas repetidas invertidas. El número teórico de fragmentos de ADN amplificados depende de la longitud del cebador y del tamaño del genoma empleado como molde. La amplificación está basada en la probabilidad de que: (i) el cebador encuentre una secuencia de ADN complementaria en el genoma, (ii) dicha secuencia esté situada en cadenas opuestas, (iii) aparezca en sentido inverso y (iv) a una distancia amplificable por PCR. La aparición de polimorfismos puede ser debida a cambios en la secuencia de unión del cebador (por ejemplo, mutaciones puntuales) que impiden la correcta unión del cebador al ADN molde. Asimismo, dichos polimorfismos pueden ser originados por modificaciones en la secuencia de ADN (por ejemplo, inserciones e inversiones) que alteran el tamaño del fragmento amplificado, impiden la amplificación del ADN porque dan lugar a sitios de unión del cebador demasiado distantes, originan delecciones del sitio de unión del cebador, etc.

Los métodos de selección de cepas utilizados en la presente invención se basan en: (i) resistencia a inhibidores de la síntesis de esteroides, a inhibidores de la respiración y a compuestos que inducen la formación de radicales libres, (ii) intensidad de color de la colonia y

producción de carotenoides en medio sólido, (iii) producción de astaxantina en oscuridad, (iv) producción de astaxantina en condiciones de elevada temperatura y (v) producción de astaxantina con fuentes de carbono alternativas a glucosa. Estos métodos permiten seleccionar eficazmente mutantes de *X. dendrorhous*. Asimismo, los procedimientos de selección de cepas y fermentación expuestos en la presente invención permiten alcanzar elevados niveles de producción de astaxantina y baja acumulación de otros carotenoides. El cultivo, en medio líquido de *X. dendrorhous* permite obtener biomasa con valor nutritivo y potenciador de la salud debido a su contenido en carotenoides, proteínas, carbohidratos, vitaminas, ácidos grasos y otros nutrientes. Dicha biomasa puede utilizarse directamente en alimentación humana y animal.

Descripción detallada de la invención

La presente invención describe una serie de procedimientos para la obtención de elevadas producciones de astaxantina con la levadura *X. dendrorhous*. La invención consiste en (i) el diseño de métodos para la obtención y selección de mutantes de *X. dendrorhous* superproductores de astaxantina y (ii) el desarrollo de condiciones mejoradas de fermentación. Los trabajos de investigación han ido encaminados a conseguir cepas de *X. dendrorhous* con una mayor concentración de astaxantina. Para ello, se han aplicado las técnicas clásicas de mutación y screening y se han optimizado tanto las materias primas como las condiciones de fermentación. La concentración de astaxantina se expresa como (i) ppm (μ g de astaxantina pura por g de biomasa seca) o (ii) porcentaje de astaxantina pura respecto de biomasa seca. Mientras que las cepas

silvestres de *X. dendrorhous* producen entre 100 y 200 ppm de astaxantina, la presente patente describe procedimientos para la producción de al menos 5.000 ppm. *X. dendrorhous* posee una gran importancia industrial para la producción 5 biotecnológica de astaxantina. De hecho, dicho proceso resulta competitivo con el procedimiento sintético utilizado industrialmente en la actualidad.

Con la finalidad de obtener cepas superproductoras de astaxantina, en primer lugar se desarrolló un procedimiento 10 mutagénico de las cepas de *X. dendrorhous* con los agentes mutagénicos etil metano sulfonato (EMS), N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) y radiación ultravioleta (UVA). Las suspensiones de células a mutar se obtuvieron a partir 15 del cultivo de *X. dendrorhous* en el medio líquido R4-062-7. El procedimiento de mutación con EMS consistió en la incubación de 10^8 células / ml en una solución de EMS al 6% en tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,0 a 20°C y 100 rpm durante 40-80 minutos. El procedimiento de mutación con NTG consistió en la incubación de 10^8 células / ml en una 20 solución de 250 µg/ml de NTG en tampón citrato sódico 0,1 M pH 5,0 a 20°C y 100 rpm durante 60-120 minutos. El procedimiento de mutación con UVA consistió en irradiar con un lámpara de 254 nm una suspensión de 10^7 células / ml en 25 solución salina a 20°C y 40 rpm durante 5-10 minutos. En los tres métodos de mutación utilizados, las células mutadas se incubaron durante 10 horas a 17-20°C y 100 rpm en medio líquido YEPD para favorecer su recuperación. Seguidamente se sembraron placas Petri que contenían medio sólido YEPDA y se incubaron a 17°C durante 4 días para 30 obtener colonias aisladas.

Las estrategias utilizadas para la selección de cepas de *X. dendrorhous* superproductoras de astaxantina fueron las siguientes: (i) resistencia a inhibidores de la síntesis de esteroides, a inhibidores de la respiración y a

compuestos que inducen la formación de radicales libres, (ii) intensidad de color de la colonia y producción de carotenoides en medio sólido, (iii) producción de astaxantina en oscuridad, (iv) producción de astaxantina en 5 condiciones de elevada temperatura y (v) producción de astaxantina con fuentes de carbono alternativas a glucosa. Para la selección de mutantes superproductores de astaxantina, se crecieron las células mutadas en medio YEPDA al que se le habían adicionado (i) compuestos que 10 alteran el potencial redox de la célula como duroquinona o peróxido de hidrógeno o (ii) inhibidores de la síntesis de esteroides, especialmente β -ionona, imidazol, dietilamina, 2-metilimidazol, nistatina y difenilamina.

Los mutantes se seleccionaron posteriormente en 15 función de su producción en medio sólido. Dicha selección se realizó en una primera fase aislando aquellas colonias que presentaban una mayor coloración roja que la cepa parental y posteriormente utilizando un método de valoración del contenido en carotenoides de la biomasa crecida en 20 medio sólido. La selección de los mutantes que presentaban un valor de absorbancia superior al de la cepa parental VKPM Y-2476 permitió seleccionar las cepas superproductores de astaxantina AST-A1 y AST-A2 (esquema 2). Los mutantes productores de astaxantina en oscuridad se seleccionaron en 25 función de su contenido en carotenoides cuando en medio sólido cuando se incubaron en la oscuridad. De esta forma se seleccionaron las cepas AST-A3, AST-A4, AST-A5, AST-A6 y AST-A7 (esquema 2). Los mutantes productores de astaxantina en condiciones de elevada temperatura se seleccionaron en 30 función de su capacidad para crecer y producir astaxantina a temperaturas superiores a las habituales (17-20°C). De esta forma se seleccionaron las cepas AST-A8, AST-A9 y AST-A10 (esquema 2) por su capacidad de crecer a 24°C y su producción de astaxantina. Las cepas de *X. dendrorhous*

capaces de producir astaxantina con fuentes de carbono alternativas a glucosa se seleccionaron en función de su capacidad para crecer y producir astaxantina en presencia de sacarosa como única fuente de carbono. De esta forma se 5 seleccionó la cepa AST-A11 (esquema 2), la cual mostró una capacidad de producción de astaxantina superior a la de la cepa parental cuando se utilizó sacarosa como fuente de carbono.

Las cepas seleccionadas se sometieron a una serie de análisis genéticos con la finalidad de establecer características diferenciales. De este modo se demostró la existencia de elementos extracromosómicos en las cepas de *X. dendrorhous*. Adicionalmente se comprobó (i) que dichos 10 elementos extracromosómicos (plásmidos) estaban compuestos por ADN bicatenario de conformación lineal y (ii) que las 15 cepas superproductoras de astaxantina poseían un patrón de elementos extracromosómicos diferente del que mostraban las 20 cepas con inferior producción. Las diferencias establecidas entre las cepas superproductoras de astaxantina y las cepas con inferior producción se confirmaron adicionalmente mediante la técnica RAPD.

Las cepas seleccionadas se fermentaron en matraz con la finalidad de determinar el nivel de producción de astaxantina en medio líquido. Para ello, se crecieron 25 matraces de inóculo y posteriormente se realizó la fermentación en matraz. Una vez concluida la fermentación (alrededor de 7 días), *X. dendrorhous* se lisó mediante agitación en vortex, se trajeron los carotenoides producidos con solventes orgánicos (por ejemplo con 30 acetona) y se determinó la concentración y pureza de astaxantina mediante HPLC. Los niveles de producción obtenidos oscilaron entre 150 y 200 mg/l. La adición al medio de cultivo de (i) agentes liberadores de radicales libres como duroquinona, (ii) compuestos inductores de la

carotenogénesis como retinal o ácidos trispóricos o (iii) precursores de la cadena hidrocarbonada como glutamato mejoró los niveles de producción de astaxantina, alcanzándose producciones de al menos 225 mg/l con retinal, 200 5 mg/l con ácidos trispóricos y 180 mg/l con glutamato. Asimismo, (i) se desarrolló un medio de cultivo que incrementó la producción específica de astaxantina y (ii) se comprobó que tanto la luz blanca como la ultravioleta incrementaban la producción de astaxantina, obteniéndose 10 los mejores resultados con ciclos de 6 horas de luz ultravioleta / oscuridad.

Las cepas seleccionadas en matraz se cultivaron en fermentadores pre-industriales con la finalidad de determinar el nivel de producción de astaxantina. Las condiciones de fermentación incluyeron el crecimiento inicial 15 del microorganismo en medios de cultivo complejos que permiten la obtención de un nivel elevado de biomasa y una máxima producción. Tras la etapa de crecimiento inicial se realizó una fase de producción caracterizada por un 20 crecimiento mínimo y máxima producción. Adicionalmente, la producción de astaxantina se incrementó mediante los siguientes procedimientos: (I) Adición al medio de cultivo de sustancias con poder de oxidación (por ejemplo duroquinona a una concentración 25-50 μ M) las cuales 25 inducen la formación intracelular de radicales libres. La adición debe realizarse durante las primeras 24 horas de fermentación para que sea realmente efectiva. Estos compuestos reducen el crecimiento (15-25%) e incrementan la producción de astaxantina (10-20%). Por tanto, el 30 incremento global de la productividad específica de la biomasa puede oscilar entre el 30-60% alcanzándose en 6-7 días de fermentación. (II) Reducción de las adiciones de la fuente de carbono fácilmente asimilable (por ejemplo,

glucosa) en una fase avanzada de fermentación y sustitución parcial por una fuente de carbono de utilización más lenta (por ejemplo etanol, glicerol, etc.) que permita mantener un crecimiento menos vigoroso pero suficiente para el 5 mantenimiento de la biomasa productiva. (III) Iluminación del cultivo en la fase de producción con luz de alta intensidad (por ejemplo, superior a 250 lux). (IV) Modificación de los valores de pH y temperatura hacia condiciones que potencian la producción sobre el crecimiento. A temperaturas alrededor de 17°C y pHs cercanos a 3 10 se ralentiza el crecimiento y se incrementa la productividad. El efecto conjunto de estas variables permitió incrementar la producción de astaxantina y obtener un elevado nivel de biomasa. Esto significa una mayor productividad por unidad de volumen de fermentador, uno de los 15 objetivos de producción más importantes desde el punto de vista industrial.

El proceso de fermentación se realizó en un medio de cultivo que contiene fuentes de carbono, fuentes de 20 nitrógeno, sales minerales y vitaminas (por ejemplo, tiamina, biotina, pantotenato cálcico, etc.). Como fuentes de carbono se pueden utilizar nutrientes ricos en carbohidratos como dextrinas, almidones, glucosa, sacarosa, fructosa o harinas vegetales ricas en algunos de estos 25 azúcares. Como fuentes de nitrógeno pueden utilizarse (i) compuestos orgánicos como extracto de levadura, harina de algodón (Pharmamedia), corn steep, harina de soja, peptonas, caseína, etc. o (ii) inorgánicos como sulfato amónico, fosfato diamónico, etc. Entre las sales minerales que pueden 30 adicionarse al medio de cultivo se encuentran fosfatos, sulfatos o cloruros de cationes monovalentes (sodio, potasio, amonio, etc.) o divalentes (calcio, magnesio, etc.). Asimismo, al medio de cultivo pueden adicionarse ciertos elementos traza como Cu, I, Fe, Mn, Mo, Zn, etc. Las 35 proporciones de los nutrientes se determinaron en base a las

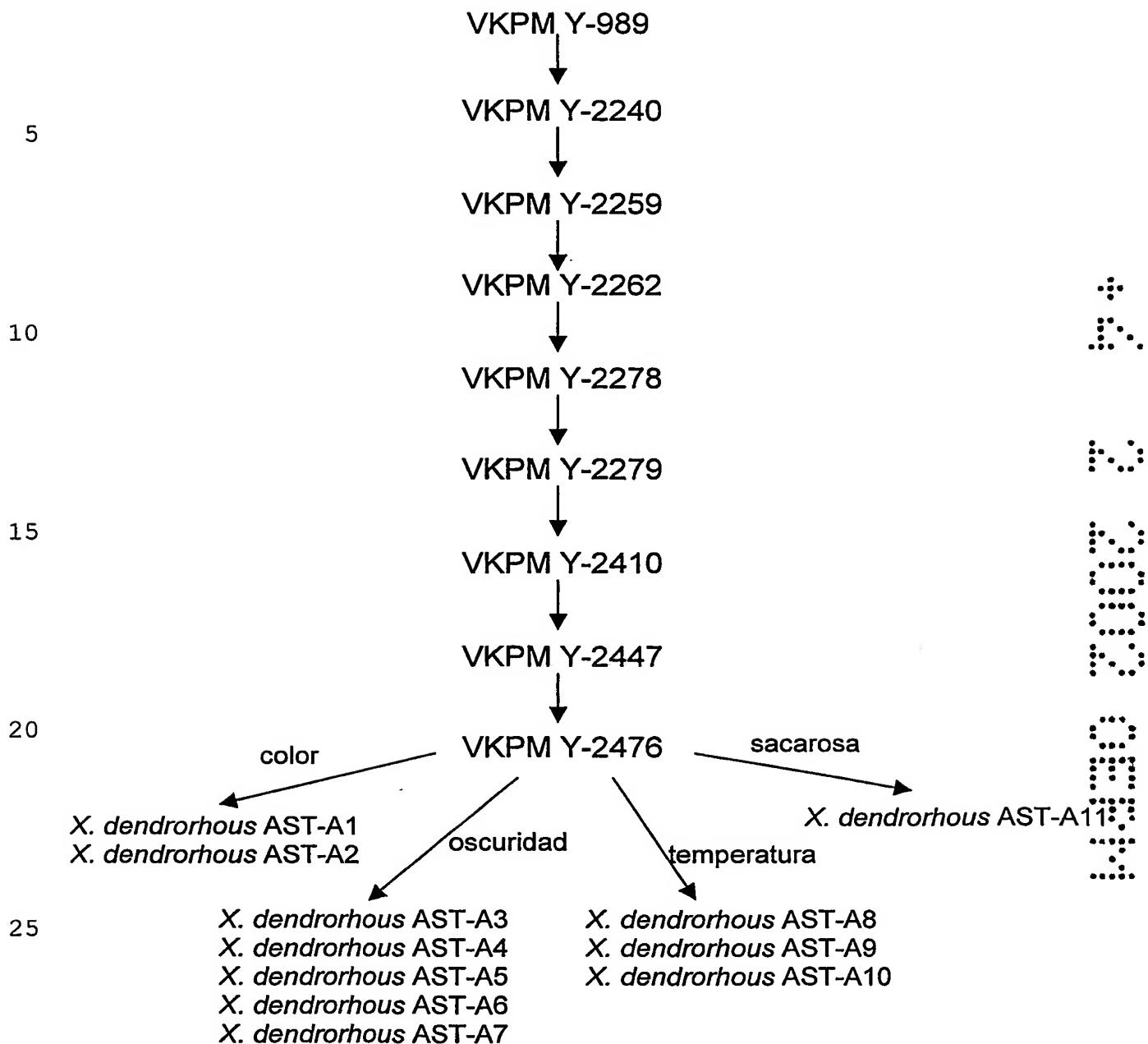
necesidades de crecimiento del microorganismo y a los niveles de producción. La fermentación se realizó en cultivo aerobio sumergido a una temperatura entre 17°C y 22°C, excepto cuando se utilizaron mutantes capaces de producir 5 astaxantina a 24°C. El pH del cultivo se permitió evolucionar libremente durante las primeras horas y posteriormente se controló en el rango 3,0-5,0 mediante la adición de álcali. El inicio del control de pH depende de la evolución del crecimiento, comenzando generalmente durante 10 las primeras 24 horas de fermentación. El proceso se caracterizó por un elevado crecimiento inicial basado en la disponibilidad de fuentes de carbono y nitrógeno, una aireación superior a 1 v/v/m (volumen / volumen / minuto) y una velocidad de agitación que garantizó un nivel de oxígeno 15 disuelto superior al 50% una vez concluida la fase de crecimiento inicial. El crecimiento de *X. dendrorhous* se mantuvo mediante adiciones de fuente de carbono (generalmente glucosa) de forma que permitiera conseguir la máxima concentración de biomasa con elevada producción 20 específica. La consecución de este objetivo posibilita una mayor productividad por volumen instalado de fermentador respecto de las tecnologías anteriormente desarrolladas.

Mediante las estrategias anteriormente descritas se consiguieron obtener caldos de fermentación con una biomasa 25 superior a 70 g/l y una producción de al menos 400 mg/l, lo cual supone producciones de astaxantina por unidad de biomasa superiores a 5.000 ppm. La biomasa obtenida procede de nuevas cepas de *X. dendrorhous*, las cuales pueden diferenciarse de otras cepas de la misma especie mediante 30 métodos de tipaje molecular. Además de la selección de cepas superproductoras de astaxantina, se ha optimizado la tecnología de fermentación para hacerla más rentable industrialmente. A pesar de que se han descrito producciones de biomasa de *X. dendrorhous* con un contenido en astaxantina

elevado, en esos casos el crecimiento de la levadura en el caldo de cultivo es muy limitado (5-30 g/l). Esto significa que el volumen de caldo que se debe procesar para obtener una cantidad importante de carotenoides es muy elevado.

5 Nuestros resultados aportan un nuevo proceso de fermentación por el que se alcanzan, no solo producciones de carotenoides elevadas, sino también una concentración de levaduras en el caldo de fermentación de 50-100 g/l. Estos resultados aportan una importante ventaja para la productividad

10 industrial y el ahorro de costes de producción.



30 **Esquema 2.** Filogenia de las cepas de *X. dendrorhous* obtenidas a partir de *X. dendrorhous* VKPM Y-989 utilizando procedimientos de mutación y selección.

La biomasa se separó del medio de cultivo por centrifugación o filtración, se secó y se utilizó para realizar una serie de pruebas de biodisponibilidad en trucha. Para ello se adicionó dicha biomasa seca al 5 preparado alimenticio de las truchas y con la mezcla se alimentaron una serie de truchas durante 2 meses. Por último, se valoró la presencia de astaxantina y carotenoides en el tejido de 10 de dichas truchas. Los resultados obtenidos (3,5 µg/g de astaxantina y 6,8 µg/g de 10 carotenoides) demostraron la capacidad de la biomasa de *X. dendrorhous* para conferir una pigmentación asalmonada a la trucha.

Depósito de microorganismos de acuerdo con el Tratado de 15 Budapest.

Las cepas de *X. dendrorhous* han sido depositadas, según lo previsto en el Tratado de Budapest, en la Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNII Genetika, Dorozhny Proezd 1, Moscú 113545, (Rusia), 20 con los siguientes números y fechas: VKPM Y-989 el 13/03/1989, VKPM Y-2240 el 20/12/1996, VKPM Y-2259 el 31/01/1997, VKPM Y-2262 el 10/06/1997, VKPM Y-2278 el 06/08/1997, VKPM Y-2279 el 31/10/1997, VKPM Y-2410 el 30/10/1998, VKPM Y-2447 el 22/09/1999 y VKPM Y-2476 el 25 06/03/2000.

Los siguientes ejemplos describen en detalle y sin limitación la presente invención.

EJEMPLO 1

30 **Estrategias de mutación de *X. dendrorhous***

En primer lugar se desarrolló un procedimiento mutagénico de las cepas de *X. dendrorhous*, para lo cual se analizaron: (i) diferentes tipos de agentes mutagénicos, (ii) concentración del mutágeno, (iii) concentración de 35 células, (iv) pH de incubación y (v) tiempo de tratamiento.

De esta forma se seleccionaron como agentes mutagénicos etilmetasulfonato (EMS), N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) y radiación ultravioleta (UVA).

Las suspensiones de células a mutar se obtuvieron 5 sembrando un cultivo líquido en matraces de 500 ml con 25 ml de medio R4-062-7 e incubándolo durante 24 horas a 17-20°C y 250 rpm. La composición del medio R4-062-7 es la siguiente: 6,2 g/l de extracto de levadura, 5,5 g/l de harina de algodón, 70 g/l de glucosa, 2 g/l de KH_2PO_4 , 0,4 10 g/l de K_2HPO_4 , 1,5 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g/l de NaCl, 0,2 g/l de CaCl_2 , 50 $\mu\text{g}/\text{l}$ de biotina, 500 $\mu\text{g}/\text{l}$ de tiamina y 2 mg/l de pantotenato cálcico, a un pH final de 5,8-6,0. La concentración de células en la suspensión fue alrededor de 10^8 células/ml. Estas células se lavaron 15 dos veces con solución salina centrifugando a 3.000 rpm y 10°C durante 3 minutos y seguidamente se ajustó su concentración a 2×10^8 células/ml.

El procedimiento de mutación con EMS consistió en la incubación de 10^8 células/ml en una solución de EMS al 6% en 20 tampón fosfato sódico 0,1 M pH 7,0 a 20°C y 100 rpm durante 40-80 minutos, consiguiendo tasas de mortalidad del 90-99%. El procedimiento de mutación con NTG consistió en la incubación de 10^8 células/ml en una solución que contenía 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de NTG en tampón citrato sódico 0,1 M pH 5,0 a 20°C y 100 rpm durante 60-120 minutos, consiguiendo tasas de mortalidad del 90-99%. Las células mutadas se lavaron tres veces con solución salina centrifugando a 3.000 rpm y 10°C durante 3 minutos y posteriormente se cultivaron en medio líquido para favorecer su recuperación. Para ello, se 30 resuspendieron en 10 ml de medio YEPD y se incubaron en matraces de 250 ml durante 10 horas a 17-20°C y 100 rpm. La composición del medio YEPD es la siguiente: 20 g/l de bacto-peptona, 10 g/l de extracto de levadura y 20 g/l de glucosa, a un pH final de 6,0.

El procedimiento de mutación con UVA consistió en el tratamiento de una suspensión de 10^7 células/ml en solución salina con la radiación de una lámpara de 254 nm a 20°C y 40 rpm durante 5-10 minutos, consiguiendo tasas de mortalidad del 90-99%. Las células mutadas se dejaron en reposo en oscuridad durante 30 minutos y seguidamente se cultivaron en medio líquido para conseguir su recuperación. Para ello, se resuspendieron en 10 ml de YEPD y se incubaron en oscuridad en matraces de 250 ml durante 10 horas a 17-20°C y 100 rpm.

Con las células mutadas se sembraron placas Petri que contenían medio sólido YEPDA y se incubaron a 17°C durante 4 días para obtener colonias aisladas. La composición del medio YEPDA es la siguiente: 20 g/l de bacto-peptona, 10 g/l de extracto de levadura, 20 g/l de glucosa y 20 g/l de agar a un pH final de 6,0. Las placas sembradas se incubaron a 17°C durante 4 días para obtener colonias aisladas.

20 **EJEMPLO 2**

Estrategias de selección de cepas de *X. dendrorhous* superproductoras de astaxantina en función de la producción de carotenoides en medio sólido.

Las colonias obtenidas a partir de las células mutadas descritas en el ejemplo 1 se sembraron directamente en el medio YEPDA o en medio YEPDA al que se habían adicionado (i) compuestos que alteran el potencial redox de la célula o (ii) inhibidores de la síntesis de esteroides. Entre los compuestos de tipo (i) se utilizaron particularmente duroquinona (100 μ M) y peróxido de hidrógeno (5 mg/l), mientras que entre los de tipo (ii) se emplearon especialmente β -ionona (50 μ l/l), imidazol (5 mM), dietilamina (10 μ M), 2-metilimidazol (5 mM), nistatina (1 mg/l) y difenilamina (100 μ M).

Las colonias procedentes de los cultivos anteriormente mencionados se sembraron de nuevo en medio YEPDA en forma de estriás de alrededor de 3 cm^2 y se incubaron a $17-20^\circ\text{C}$ durante 4 días en presencia de luz. En una primera fase del 5 programa de selección de cepas fue posible aislar una serie de estriás que presentaban mayor coloración roja que la cepa parental. Posteriormente, la coloración roja intensa de las cepas parentales impidió la selección directa por color y se desarrolló un método de valoración de 10 carotenoides a partir de la biomasa crecida en medio sólido. Este método consistió en retirar de cada estria la biomasa correspondiente a $0,8 \text{ cm}^2$ y resuspenderla en 1 ml de dimetilsulfóxido. Los carotenoides se extrajeron mediante agitación en vórtex durante 2 minutos y centrifugación a 15 12.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. La producción de carotenoides se valoró mediante medición de la absorbancia del sobrenadante a 474 nm. La selección de las estriás que presentaban un valor de absorbancia superior al de la cepa parental VKPM Y-2476 permitió 20 seleccionar los mutantes superproductores de astaxantina AST-A1 y AST-A2.

EJEMPLO 3

Estrategias de selección de cepas de *X. dendrorhous* 25 superproductoras de astaxantina en oscuridad

El procedimiento consistió en la evaluación de los mutantes por su capacidad de crecer y producir astaxantina en ausencia de luz. Para ello se sembraron una serie de placas de YEPDA con una suspensión de células mutadas y se 30 incubaron a 22°C durante 4 días en ausencia de luz. Seguidamente se seleccionaron un total de 103 colonias que presentaban mayor coloración y crecimiento. Estas colonias se sembraron de nuevo en YEPDA en forma de estriás de alrededor de 3 cm^2 y se incubaron a 22°C durante 4 días en

ausencia de luz. Con la biomasa correspondiente a 0,8 cm² de cada estría se sembraron matraces de 50 ml con 10 ml de medio R4-062-7, los cuales se incubaron durante 72 horas a 20°C y 250 rpm en ausencia de luz. A partir de estos 5 cultivos se seleccionaron 5 mutantes (AST-A3, AST-A4, AST-A5, AST-A6 y AST-A7) con mayor producción de carotenoides, los cuales se ensayaron en fermentaciones tanto en oscuridad como en presencia de luz, observándose que la producción de astaxantina duplicaba a la de la cepa 10 parental VKPM Y-2476 en oscuridad y era equivalente en presencia de luz.

EJEMPLO 4

15 **Estrategias de selección de cepas de *X. dendrorhous* superproductoras de astaxantina en condiciones de elevada temperatura**

El procedimiento consistió en el análisis de los mutantes por su capacidad de crecer y producir astaxantina a temperaturas superiores a las habituales para *X. 20 dendrorhous* (17-20°C). El programa se realizó en dos fases: en primer lugar a 22°C y posteriormente a 24°C. Para ello, se sembró una suspensión de células mutadas con NTG procedentes de la cepa VKPM Y2476 en placas con YEPDA y se incubaron a 22°C durante 6 días en ausencia de luz. En 25 estas condiciones la cepa parental VKPM Y-2476 es incapaz de crecer. De esta forma se aislaron 100 colonias por su capacidad de crecer a 22°C. Estas colonias se sembraron de nuevo en YEPDA en forma de estrías de unos 3 cm² y se incubaron a 22°C durante 4 días en presencia de luz. 30 Seguidamente se realizó una valoración de la producción de carotenoides en medio sólido y se seleccionaron un total de 10 cepas, las cuales se fermentaron en medio líquido tanto a 20°C como a 22°C. Finalmente se preseleccionaron 4 cepas.

Una suspensión celular conjunta de las cepas 4 cepas anteriormente seleccionadas se sometió a mutación con NTG tal y como se indica en el ejemplo 1, sembrando las células mutadas en YEPDA e incubando seguidamente las placas a 5 23,5°C durante 6 días en ausencia de luz. De esta forma se seleccionaron 200 colonias, las cuales se sembraron de nuevo en YEPDA en forma de estriás de unos 3 cm² y se incubaron a 24°C durante 4 días en presencia de luz. Posteriormente se valoró la producción de carotenoides en 10 medio sólido, seleccionándose un total de 6 cepas. Una vez analizada la producción de astaxantina a 24°C en medio líquido de estas 6 cepas, se seleccionaron 3 de ellas, las cuales se denominaron AST-A8, AST-A9 y AST-A10.

15 **EJEMPLO 5**

Estrategias de selección de cepas de *X. dendrorhous* capaces de producir astaxantina con fuentes de carbono alternativas a glucosa

Las colonias obtenidas a partir de las células mutadas 20 descritas en el ejemplo 1 se sembraron directamente en el medio YEPDA al que se habían adicionado glucosa (20 g/l) o sacarosa (20 g/l). Las colonias procedentes de los cultivos anteriormente mencionados se sembraron de nuevo en medio YEPDA-glucosa o YEPDA-sacarosa en forma de estriás de 25 alrededor de 3 cm² y se incubaron a 17-20°C durante 4 días en presencia de luz. Posteriormente se valoraron los carotenoides en la biomasa correspondiente a 0,8 cm² de cada estriá tal y como se indica en el ejemplo 2 y se seleccionaron las estriás que presentaban un valor de 30 absorbancia superior al de la cepa parental VKPM Y-2476. De esta forma se seleccionó la cepa AST-A11, la cual mostró una producción de astaxantina superior a VKPM Y-2476 utilizando como fuente de carbono glucosa o sacarosa.

EJEMPLO 6

Análisis genético de una serie de una serie de cepas de *X. dendrorhous* que presentan diferente producción de astaxantina

5 6.1. Caracterización de los elementos extracromosómicos de *X. dendrorhous*

Con la finalidad de comparar una serie de cepas silvestres de *X. dendrorhous* con las cepas superproductoras de astaxantina, se realizó el análisis de sus ácidos nucleicos en gel del 0,8% de agarosa. Las 4 cepas silvestres analizadas fueron: CECT 1690 (también denominada ATCC 24202 ó CBS 5905), CECT 11028 (también denominada ATCC 24203 ó CBS 5908), CBS 6938 y ATCC 24229. Por su parte las cepas superproductoras analizadas fueron las siguientes: 10 VKPM Y-989, VKPM Y-2240, VKPM Y-2259, VKPM Y-2279, VKPM Y-2410 y VKPM Y-2476. Una vez purificado el ADN total de las cepas anteriormente mencionadas, se trató con RNasa y se analizó por electroforesis. El resultado se muestra en la figura 1. Como puede observarse, las cepas superproductoras 15 poseen un patrón de ácidos nucleicos extracromosómicos diferente del que presentan las cepas silvestres. El patrón más parecido al de las cepas superproductoras lo posee la cepa *X. dendrorhous* ATCC 24229.

En diferentes cepas de *X. dendrorhous* se ha descrito 20 la presencia de elementos genéticos extracromosómicos, principalmente ARNs de doble cadena (ARNds) que en algunas cepas se han encontrado encapsidados en partículas similares a virus (VLP, virus like particles) (Castillo A. and Cifuentes V. 1994. Curr. Genet. 26: 364-368; Pfeiffer, H. 25 et al. (1996). Curr. Genet. 30: 294-297). Con la finalidad de determinar si los elementos extracromosómicos de las cepas superproductoras eran moléculas de ARNds, se trataron con RNasa A (350 ng/ml) en dos concentraciones salinas 30 distintas: SSC 0,01x y SSC 2x. Adicionalmente se preparó

una muestra control sin tratar con RNasa A en SSC 0,01x. Dichas muestras se incubaron durante 30 minutos a 37°C y posteriormente se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Como se puede observar en la figura 5 2, ningún elemento extracromosómico se degradó tras la incubación con RNasa A, por lo que se concluyó que dichos ácidos nucleicos no se trataba de moléculas de ARNds.

Con el fin de determinar la naturaleza de dichos elementos extracromosómicos, se trató una muestra de ADN 10 total de *X. dendrorhous* Y-2410 con distintas enzimas modificadoras de ácidos nucleicos: RNasa A, RNasa H, nucleasa S1, DNasa I y la endonucleasa de restricción *BamHI*. Los resultados se muestran en la figura 3. La digestión con RNasa A confirmó los resultados anteriormente 15 descritos. Sin embargo, (i) la completa desaparición tanto de los elementos extracromosómicos como del ADN total en el carril 9 (tratamiento con DNasa I) y (ii) su susceptibilidad a la digestión con la endonucleasa de restricción *BamHI* (carril 10) demostró que se trataba de 20 moléculas de ADN.

Seguidamente se procedió a determinar la conformación de los elementos extracromosómicos en las cepas *X. dendrorhous* CBS 6938 y *X. dendrorhous* Y-2410. Para ello, se analizó una muestra de ADN total mediante electroforesis 25 bidimensional en gel de agarosa al 1%. Como puede observarse en la figura 4, el patrón de elementos extracromosómicos de ambas cepas es el mismo en las dos dimensiones del gel, es decir, los fragmentos de ADN migran conforme a su tamaño. Esto indica que las moléculas de ADN detectadas 30 en *X. dendrorhous* poseen conformación lineal. De estos datos se concluye que los elementos extracromosómicos de las cepas analizadas son plásmidos lineales formados por ADN de doble cadena.

6.2. Determinación del polimorfismo genético de una serie de cepas de *X. dendrorhous* mediante la técnica RAPD

El objetivo consiste en determinar la existencia de diversidad genética en las distintas cepas de *X. dendrorhous* mediante la amplificación al azar de su ADN por PCR. Esta técnica se denomina RAPD (randomly amplified polymorphic DNA). Los polimorfismos se detectan debido a la presencia de (i) cambios (por ejemplo mutaciones puntuales) en la secuencia de unión del cebador, (ii) alteraciones en la secuencia de ADN (por ejemplo inserciones e inversiones) que dan lugar a modificaciones del tamaño, (iii) inserciones que cambian el tamaño de un fragmento de ADN amplificado, (iv) desaparición del sitio de unión del cebador, etc. En este estudio se incluyeron las 4 cepas silvestres y las 6 cepas superproductoras descritas en el apartado 6.1. Para el análisis se utilizó el cebador 5'-CATGTGTGGCGGGCA-3' previamente descrito (Williams J.G. et al. 1990. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535), el cual había sido utilizado previamente en *X. dendrorhous* (Meyer P.S. et al. 1994. Biotechnol. Tech. 8: 1-6). El ADN total se desnaturizó mediante calentamiento durante 5 minutos a 96°C y la reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 µl en un GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer). Se realizaron 35 ciclos de amplificación en las siguientes condiciones: anillamiento a 30°C durante 1 minuto, polimerización durante 2 minutos a 72°C y desnaturización durante 1 minuto a 92°C. En el último ciclo el tiempo de polimerización se extendió a 10 minutos a 72°C, seguido de un enfriamiento a 4°C. Los fragmentos de ADN amplificados mediante esta técnica se sometieron a electroforesis de agarosa al 1% y los resultados obtenidos se muestran en la figura 5. Como puede observarse, las cepas superproductoras de astaxantina generaron un patrón equivalente, mientras que la cepa *X. dendrorhous* ATCC 24229 (la cual resultó ser

la más parecida a las cepas superproductoras en el análisis realizado en el apartado 6.1) presentó un patrón de amplificación distinto al de las cepas superproductoras. De esta experimentación se puede concluir que las cepas 5 superproductoras de astaxantina difieren genéticamente de todas las cepas silvestres analizadas.

EJEMPLO 7

Procedimiento de producción de astaxantina mediante la 10 fermentación en matraz de *X. dendrorhous*

En primer lugar se sembraron slants con medio R3-02-5 y se incubaron durante 5 días a 17-20°C. La composición del medio R3-02-5 es la siguiente: bactopeptona 6,5 g/l, extracto de levadura 2 g/l, KH_2PO_4 0,4 g/l, K_2HPO_4 1,3 g/l, 15 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,3 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,3 g/l, NaCl 0,1 g/l, CaCl_2 0,1 g/l, glucosa 50 g/l, agar 20 g/l, H_3BO_3 500 $\mu\text{g}/\text{l}$, CuSO_4 40 $\mu\text{g}/\text{l}$, KI 100 $\mu\text{g}/\text{l}$, FeCl_3 200 $\mu\text{g}/\text{l}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 400 $\mu\text{g}/\text{l}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 200 $\mu\text{g}/\text{l}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 400 $\mu\text{g}/\text{l}$, pH 6,0. Una vez crecido el microorganismo, cada slant se resuspendió en 3 20 ml de solución salina y con esta suspensión se sembraron matraces de 500 ml con 25 ml de medio R4-062-7 a razón de 1,5 ml de suspensión de células por matraz. Estos inóculos se incubaron durante 48 horas a 17-20°C y 250 rpm.

Los inóculos se utilizaron para sembrar matraces de 25 500 ml (3 indentaciones) con 25 ml de medio R4-20 a razón de 2,5 ml por matraz. La composición del medio R4-20 es la siguiente: extracto de levadura 6,2 g/l, harina de algodón 5,5 g/l, KH_2PO_4 2 g/l, K_2HPO_4 0,4 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g/l, 30 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/l, NaCl 0,2 g/l, CaCl_2 0,2 g/l, CaCO_3 1,6 g/l, glucosa 200 g/l, biotina 50 $\mu\text{g}/\text{l}$, tiamina 500 $\mu\text{g}/\text{l}$, pantotenato cárboxico 2 mg/l, pH 5,8-6,0. Estos matraces se incubaron a 17-20°C en presencia de luz durante 5-7 días. Los niveles de producción de astaxantina de la cepa VKPM Y-

2476 en estas condiciones fueron alrededor de 150 mg/l y 4.000 ppm con una biomasa de 37 g/l.

EJEMPLO 8

5 Mejora de la producción de astaxantina mediante modificaciones en el medio de cultivo

Con la finalidad de mejorar la producción de astaxantina se probó la adición de diferentes compuestos al medio de cultivo: (i) agentes liberadores de radicales libres como duroquinona (25-50 μ M), (ii) compuestos inductores de la carotenogénesis en otros microorganismos productores de carotenoides, como retinal (35 μ M) y ácidos trispóricos (50-100 μ g/ml), (iii) moléculas precursoras de la cadena hidro-carbonada como glutamato (5,5 mg/ml) en 10 lugar de harina de algodón. La fermentación se realizó tal y como se describe en el ejemplo 7 y los resultados obtenidos se muestran en la figura 6. Los niveles de producción de astaxantina obtenidos en las mejores condiciones fueron de 225 mg/l y 5.000 ppm con una biomasa de 45 g/l. Como puede comprobarse, todos estos compuestos dieron lugar a incrementos de producción respecto al medio 15 de cultivo original R4-20.

EJEMPLO 9

25 Desarrollo de un medio de cultivo que incrementa la producción específica de astaxantina

Con la finalidad de incrementar la producción específica de astaxantina (mg de astaxantina / g de biomasa) se desarrolló un medio de cultivo utilizando el programa 30 informático GALOP basado en algoritmos genéticos y desarrollado por Weuster-Botz D. (Institut fur Biotechnologie, Forschungszentrum Julich GmbH, Julich, Germany). El diseño se basó en mantener constantes las concentraciones de algunos de los componentes del medio de

cultivo (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , CaCl_2 y CaCO_3) y analizar concentraciones variables de otros componentes (glucosa, glicerol, peptona, corn steep sólido (CSS), sulfato amónico y aceite de soja). Mediante el programa 5 GALOP se diseñaron 7 medios de cultivo que constaban de los mismos componentes pero en concentraciones variables. En la tabla I se muestra la composición de los medios de cultivos analizados en la 4^a generación.

10

Tabla I

Medio de cultivo	Glucosa 50% (ml)	Glicerol 50% (μl)	Peptona 10% (ml)	CSS 10% (ml)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10% (μl)	Aceite soja (ml)	Sales 25x (ml)	Agua (ml)
P	10,0	5	1,5	1,4	500	0,1	3	8,50
1	9,9	2621	1,6	1,4	572	0,1	3	8,50
2	6,7	1987	1,5	1,4	1746	1,6	3	7,06
3	10,0	5	1,5	0,2	762	0,1	3	9,43
4	6,9	325	1,9	1,7	117	0,1	3	10,96
5	10,0	639	1,5	0,4	1778	0,1	3	7,58
6	9,9	4683	1,9	0,2	508	0,1	3	4,76

La solución de sales 25x contenía por litro: 50 g de KH_2PO_4 , 10 g de K_2HPO_4 , 37,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g de NaCl , 5 g de CaCl_2 y 40 g de CaCO_3 . En la figura 7 se muestran los 15 resultados de producción específica obtenidos con estos medios de cultivo tras realizar 4 generaciones sucesivas de optimización de su composición. Como puede comprobarse, se consiguió desarrollar un medio de cultivo que incrementó la producción específica de astaxantina de la cepa X. 20 *dendrorhous* Y-2410 desde 2.096 ppm ($\mu\text{g/g}$) (medio de cultivo P) hasta 4.490 ppm (medio de cultivo 5) sin disminución de la producción absoluta (mg/l).

EJEMPLO 10

Mejora de la producción de astaxantina mediante la iluminación del cultivo

5 Con la finalidad de desarrollar métodos de producción de astaxantina mejorados, se fermentó en matraz la cepa Y-2476 modificando la longitud de onda de la iluminación utilizada. Para ello, se realizaron una serie de fermentaciones tal y como se describe en el ejemplo 7. Los 10 matraces se incubaron a 17-20°C en presencia o ausencia de luz durante 6 días. Adicionalmente se probaron diferentes tipos de luz: blanca, azul, verde, amarilla y ultravioleta. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 8A. Como 15 puede comprobarse, tanto la luz blanca como la ultravioleta dieron lugar a los incrementos de producción más significativos respecto de las fermentaciones realizadas en oscuridad.

Asimismo, se comparó la producción de astaxantina de la cepa Y-2476 en fermentaciones en matraz iluminadas 20 permanentemente o mediante ciclos de iluminación / oscuridad de 6, 12 ó 24 horas. Dichos ciclos se realizaron tanto con luz blanca como con luz ultravioleta. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 8B. Como puede comprobarse, los ciclos de 6 horas de luz ultravioleta / oscuridad dieron lugar a los incrementos de producción más significativos.

EJEMPLO 11

Procedimiento de producción de astaxantina mediante la 30 fermentación de *X. dendrorhous* en fermentador de 10 litros

Los matraces de inóculo (2 litros con 200 ml de medio R4-062-7, ejemplo 1) se sembraron con las células de un slant por matraz y se incubaron a 20°C bajo iluminación con agitación orbital a 250 rpm durante 48 horas. De esta forma

se obtuvo un caldo con un 7% de biomasa (expresado como volumen celular sedimentado o PCV, pellet cell volume) y un pH en torno a 3. Seguidamente se inoculó un fermentador intermedio de crecimiento vegetativo con medio R4-10-3P con el 0,4% (v/v) del inóculo. La composición por litro del medio R4-10-3P es la siguiente: extracto de levadura 6,2 g, harina de algodón 5,5 g, glucosa 100 g, KH_2PO_4 2 g, K_2HPO_4 0,4 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g, $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ 5 g, NaCl 0,2 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,4 g y tiamina 0,5 mg, a un pH final de 5,8-6,0.

El vegetativo se incubó a 20°C durante 48 horas con la agitación suficiente para mantener como mínimo un 50% de oxígeno disuelto (DO_2), aireación a 1,5 vvm (volumen/volumen/minuto) y control de pH a 4,5 con amoniaco a una concentración del 12,5%. El crecimiento obtenido en la fase vegetativa alcanzó un 30-35% de biomasa (expresado como PCV). La fase de producción se realizó en un fermentador con vaso de vidrio de borosilicato con medio R4-10 cuya composición con respecto al volumen después de siembra (9 litros) es la siguiente: extracto de levadura 6,2 g/l, harina de algodón 5,5 g/l, KH_2PO_4 2 g/l, K_2HPO_4 0,4 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,5 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 5 g/l, NaCl 0,2 g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l, solución de microelementos 2 ml/l y polipropilénglicol 2025 0,9 g/l, ajustando el pH a 5,4 con NaOH. La composición de la solución de microelementos es la siguiente: ácido bórico 1 mg, molibdato sódico dihidrato 0,4 mg, sulfato de zinc heptahidrato 0,8 mg, cloruro férrico hexahidrato 0,4 mg, sulfato de cobre pentahidrato 0,8 mg, yoduro potásico 0,2 mg, sulfato de manganeso tetrahidrato 0,8 mg. El medio se enrasó a un volumen de 6 litros y tras la esterilización se añadieron 1,05 litros de jarabe de glucosa (para lograr una concentración de glucosa de 100 g/l tras la siembra) y 1 ml/l de solución de vitaminas (biotina 0,1 g/l, tiamina 1 g/l y pantotenato cálcico 4 g/l). El fermentador se inoculó con 2 litros del cultivo vegetativo y se ajustó a las siguientes condiciones de

cultivo: (I) Aireación: 1,5 vvm. (II) Agitación: 700 rpm hasta las 18 horas, incrementando posteriormente hasta 1.200 rpm para mantener $DO_2 > 50\%$. (III) Presión: 0 kg/cm². (IV) Temperatura: 20°C hasta las 72 horas y posteriormente 5 a 17°C. (V) pH: control de límite inferior a 4,5 con amoniaco al 12,5% hasta las 72 horas disminuyendo posteriormente el límite a 3,0. (VI) DO_2 : control con límite inferior al 50% mediante agitación. (VII) Iluminación: 6 tubos fluorescentes dispuestos sobre la superficie del vaso 10 con una potencia total de 80 vatios.

Las adiciones realizadas fueron las siguientes: (I) Glucosa en solución al 50% conforme al siguiente programa de adición (expresado como gramos de glucosa pura por litro y hora): 0 entre las 0-25 horas, 2,5 entre las 26-51 horas, 15 2,3 entre las 52-116 horas y 1,6 entre las 117-212 horas. El consumo total de glucosa al 50% en adiciones fue de 6,47 litros. (II) Etanol absoluto: 0,5% cada 24 horas desde las 72 horas. El consumo total fue de 270 ml. (III) Antiespuma: Polipropilenglicol (PPG), cuyo consumo total fue de 200 ml. 20 (IV) Amoniaco al 12,5% para control de pH, con un consumo total fue de 464 ml.

Asimismo, se realizaron las cosechas parciales necesarias para mantener el volumen de trabajo en 10 litros. El volumen total de cosechas parciales fue de 2,6 25 litros y el volumen final del tanque de 8,5 litros. La fermentación finalizó a las 212 horas con una biomasa del 32% (expresada como PCV) que era equivalente a 84 g/l (expresada como peso seco). La concentración de astaxantina valorada por HPLC fue de 425 mg/l, de forma que la riqueza 30 en astaxantina de la biomasa seca superó las 5.000 ppm. La concentración total de carotenoides acumulados fue de 623 mg/l (7.416 ppm). La evolución de la fermentación se ilustra en la figura 9.

EJEMPLO 12

Procedimiento de producción de astaxantina mediante la fermentación de *X. dendrorhous* en fermentador de 800 litros

El medio de cultivo de inóculo (R4-062-7, ejemplo 1) se preparó en matraces Erlenmeyer de 2.000 ml a razón de 200-400 ml por matraz. Una vez esterilizados se sembraron con *X. dendrorhous* y se incubaron a 20°C y 250 rpm durante 48 horas. El inóculo se transfirió estérilmente en una proporción del 0,4% (v/v) a un tanque intermedio de crecimiento vegetativo con medio de cultivo R4-10-2 cuya composición por litro es: extracto de levadura 6,2 g, Pharmamedia 5,5 g, jarabe de glucosa (70% p/p) 143 g (esterilizado por separado), corn steep sólido 24 g, fosfato monopotásico 2 g, fosfato dipotásico 0,4 g, sulfato magnésico heptahidrato 1,5 g, fosfato diamónico 5 g, cloruro sódico 0,2 g, cloruro cálcico dihidrato 0,4 g, antiespuma 0,1 g, clorhidrato de tiamina 1 mg, ácido bórico 1 mg, molibdato sódico dihidrato 0,4 mg, sulfato de zinc heptahidrato 0,8 mg, cloruro férrico hexahidrato 0,4 mg, sulfato de cobre pentahidrato 0,8 mg, yoduro potásico 0,2 mg, sulfato de manganeso tetrahidrato 0,8 mg. Su pH inicial fue de 5,6. El vegetativo se incubó a 17°C durante 54 h, con una aireación de 1,5 v/v/m y una presión en cabeza de 1 atmósfera, hasta que alcanzó un pH inferior a 3,5. Seguidamente se realizó una segunda fase de crecimiento en el medio de cultivo R4-10-2 hasta alcanzar una biomasa del 30-35% (expresada como PCV). El fermentador de producción (800 litros de capacidad) con medio R4-10-2 se sembró con un 20% (v/v) del cultivo vegetativo.

La fermentación se realizó con el siguiente programa de temperaturas: 19°C hasta las 16 horas, 18°C desde las 16 hasta las 60 horas y 17°C hasta el final. Se utilizó agitación variable entre 150 y 275 rpm y una aireación de 1,5 v/v/m. La presión en cabeza se mantuvo en 0,5 atm. El control de pH se realizó con hidróxido amónico 25%, manteniéndose superior a 4,5 hasta las 24h, a 3,5 desde las 24 hasta las 60 horas y a 3,0 desde las 60 horas hasta el

final. El oxígeno disuelto se mantuvo en un rango superior al 50%, incrementando la agitación cuando fue necesario. Durante la fermentación se realizaron adiciones de glucosa (expresado en Kg/m³/hora) de acuerdo con el siguiente 5 programa: 0 entre las 0-24 horas, 4,41 entre las 24-48 horas, 3,77 entre las 48-70 horas, 2,08 entre las 70-94 horas y 2,60 entre las 94-184 horas.

Asimismo, cuando fue necesario se realizaron (i) adiciones de antiespuma y (ii) cosechas parciales para 10 mantener el volumen en el fermentador en torno al 75% de su capacidad total. La iluminación del cultivo se realizó por medio de un tubo de borosilicato de 1 m de longitud sumergido en el cultivo que contenía 6 tubos fluorescentes de 54 w (total 324 w). La fermentación se prolongó durante 15 184 horas, al cabo de las cuales se obtuvo una producción de astaxantina de 400 mg/l y una biomasa de 90 g/l (expresada como peso seco), lo cual supone una riqueza de astaxantina en la biomasa seca superior a 4.400 ppm.

La adición de 50 µM de duroquinona supuso incrementos 20 de producción de astaxantina de alrededor del 15-20%.

EJEMPLO 13

Proceso de recuperación de la biomasa de *X. dendrorhous* rica en astaxantina y análisis de biodisponibilidad en 25 trucha

La levadura *X. dendrorhous*, fermentada en cultivo puro tal y como se describe en los ejemplos anteriores, se transfirió desde el fermentador hasta un tanque refrigerado donde permaneció hasta que se recuperó por centrifugación o 30 filtración. La concentración preliminar del caldo se realizó mediante centrifugas en continuo o unidades de filtración, dando lugar a caldos concentrados. Con la finalidad de proteger la astaxantina durante el procesamiento de la biomasa en algunos casos se adicionó el antioxidante 35 etoxiquina a la biomasa concentrada. Seguidamente, se

procedió al secado de la biomasa concentrada, utilizando métodos convencionales, de forma que la mayor parte de las células no se rompieran durante el proceso. Por último se realizó el almacenamiento de la biomasa seca de forma que 5 quedara protegida de luz, oxígeno y humedad.

La biomasa seca se mezcló con un preparado alimenticio utilizado en piscicultura de forma que la concentración de astaxantina en la mezcla fuera de 75 ppm. Seguidamente, la mezcla se extrusionó en forma de cilindros o pellets, con 10 los cuales se alimentaron una serie de truchas durante dos meses. Posteriormente se sacrificaron 10 truchas seleccionadas al azar y se valoró el contenido en astaxantina y carotenoides en su tejido muscular. Asimismo, se analizó el contenido en astaxantina y carotenoides en otras 10 truchas 15 control no alimentadas con los pellets anteriormente descritos. Los valores medios obtenidos se muestran en la tabla siguiente:

	Truchas alimentadas con biomasa seca	Truchas control no alimentadas con biomasa seca
Astaxantina (µg/g)	3,5	0,0
Carotenoides (µg/g)	6,8	0,1

20 Los resultados de la prueba de biodisponibilidad demuestran que la astaxantina y el resto de los carotenoides presentes en la biomasa seca de *X. dendrorhous* se transfirieron a los tejidos de la trucha confiriéndole una atractiva coloración asalmonada.

25

Descripción detallada de las figuras

Figura 1. Fotografía de un gel de agarosa en él que se muestra el ADN total de una serie de cepas de *X.*

dendrorhous que presentan diferente producción de astaxantina. Carril 1: Marcador de peso molecular de ADN cuyas bandas poseen los siguientes tamaños expresados en pares de bases: 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 5 1.353, 1.078, 872, 603 y 300. Carril 2: *X. dendrorhous* CECT 1690 (también denominada ATCC24202 ó CBS 5905). Carril 3: *X. dendrorhous* CECT 11028 (también denominada ATCC 24203 ó CBS5908). Carril 4: *X. dendrorhous* CBS 6938. Carril 5: *X. dendrorhous* ATCC 24229. Carril 6: *X. dendrorhous* Y-989. 10 Carril 7: *X. dendrorhous* Y-2240; Carril 8: *X. dendrorhous* Y-2259. Carril 9: *X. dendrorhous* Y-2279. Carril 10: *X. dendrorhous* Y-2410. Carril 11: *X. dendrorhous* Y-2476. En la parte superior de la figura aparece el ADN total (tamaño superior a 23 kb) y bajo él se encuentran los elementos 15 extracromosómicos (tamaño entre 2,3 y 9 kb).

Figura 2. Fotografía de un gel de agarosa en el que se muestra ADN total de una serie de cepas de *X. dendrorhous* en tres condiciones diferentes: (A) Control (SSC 0,01x, sin 20 tratamiento con Rnasa A). (B) Tratado con Rnasa A a una concentración de 350 ng/ml en SSC 0,01x. (C) Tratado con RNasa A a una concentración de 350 ng/ml en SSC 2x. Carriles 1-3: *X. dendrorhous* CECT 1690 (también denominada ATCC24202 ó CBS 5905). Carriles 4-6: *X. dendrorhous* CECT 25 11028 (también denominada ATCC 24203 ó CBS5908). Carriles 7-9: *X. dendrorhous* CBS 6938. Carriles 10-12: *X. dendrorhous* ATCC 24229. Carriles 13-15: *X. dendrorhous* Y-989. Carriles 16-18: *X. dendrorhous* Y-2240. Carriles 19-21: *X. dendrorhous* Y-2410. Carriles 22-24: *X. dendrorhous* Y-30 2476. Carril 25: Marcador de peso molecular de ADN cuyas bandas poseen los siguientes tamaños expresados en pares de bases: 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322 y 2.027.

Figura 3. Fotografía de un gel de agarosa en el que se muestra el ADN total de *X. dendrorhous* Y-2410 tratado con distintas enzimas modificadoras de ácidos nucleicos. Carril 1: Marcador de peso molecular de ADN cuyas bandas poseen los siguientes tamaños expresados en pares de bases: 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027, 1.353 y 1.078. Carril 2: ADN control sin tratamiento. Carril 3: Tratamiento con RNasa A en 2x SSC. Carril 4: Tratamiento con RNasa A en 1x SSC. Carril 5: Tratamiento con RNasa A en 0,02x SSC. Carril 6: Tratamiento con RNasa A en 0.01x SSC. Carril 7: Tratamiento con RNasa H. Carril 8: Tratamiento con nucleasa S1. Carril 9: Tratamiento con DNasa I. Carril 10: Digestión con la endonucleasa de restricción BamHI.

15 **Figura 4.** Izquierda: gel de agarosa de las cepas *X. dendrorhous* CBS 6938 (carril 1) y *X. dendrorhous* Y-2410 (carril 2). Centro: segunda dimensión de la electroforesis del carril 1 correspondiente a *X. dendrorhous* CBS 6938. Derecha: segunda dimensión de la electroforesis del carril 20 2 correspondiente a *X. dendrorhous* Y-2410.

Figura 5. Fotografía de un gel de agarosa en la que se muestra el ADN de una serie de cepas de *X. dendrorhous* amplificado mediante la técnica RAPD (randomly amplified 25 polymorphic DNA). Carriles 1 y 12: Marcador de peso molecular de ADN cuyas bandas poseen los siguientes tamaños expresados en pares de bases: 1.353, 1.078, 872, 603 y 300. Carril 2: *X. dendrorhous* CECT 1690 (también denominada ATCC24202 ó CBS 5905). Carril 3: *X. dendrorhous* CECT 11028 30 (también denominada ATCC 24203 ó CBS5908). Carril 4: *X. dendrorhous* CBS 6938. Carril 5: *X. dendrorhous* ATCC 24229. Carril 6: *X. dendrorhous* Y-989. Carril 7: *X. dendrorhous* Y-2240. Carril 8 : *X. dendrorhous* Y-2259. Carril 9: *X.*

dendrorhous Y-2279. Carril 10: *X. dendrorhous* Y-2410.
Carril 11: *X. dendrorhous* Y-2476.

Figura 6. Producción de astaxantina (ordenadas) mediante
5 fermentación en matraz de la cepa *X. dendrorhous* Y-2476,
adicionalando al medio de fermentación los siguientes
compuestos: duroquinona -D-, retinal -R-, ácidos
trispóricos -AT- o glutamato -GT-. La producción se expresa
en porcentaje respecto de la condición estándar -P- (100%).

10

Figura 7. Producción específica de astaxantina de *X. dendrorhous* Y-2410 en 7 medios de cultivo diferentes
diseñados mediante el programa GALOP, el cual está basado
en algoritmos genéticos. Los medios de cultivo denominados
15 P, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 se muestran en el eje de abscisas. En
el eje de ordenadas se muestran los valores de producción
específica expresados en ppm ($\mu\text{g/g}$).

Figura 8. Producción de astaxantina mediante fermentación
20 en matraz de la cepa *X. dendrorhous* Y-2476. (A) Iluminando
el cultivo con diferentes tipos de luz: Oscuridad -O-,
blanca -B-, azul -A-, verde -V-, amarilla -AM- y ultra-
violeta -UV-; (B) Iluminando el cultivo con diferentes ci-
clos de luz blanca o ultravioleta: Blanca permanente -BP-;
25 UVA permanente -UVAP-; Blanca 24 horas -B24h-; UVA24h-;
Blanca 12 horas -B12h-; UVA 12h; UVA6h. La producción se
expresa en porcentaje respecto de la condición estándar
(100%).

30 **Figura 9.** Evolución de la producción de astaxantina durante
la fermentación de la cepa *X. dendrorhous* Y-2476 en
fermentador de 10 litros. Ordenadas (izquierda): PCV (%) ■,
DO2 (%) — y glucosa (g/l) ♦. Ordenadas (derecha):

astaxantina HPLC (mg/l) ●, carotenoides (mg/l) ▲, Abcisas:
tiempo en horas.

REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento de producción de astaxantina por fermentación caracterizado por cultivar las cepas de *X. dendrorhous* que aparecen en el esquema 2 de la descripción o sus mutantes o derivados transformados capaces de producir en matraz al menos 4.000 ppm de astaxantina a los 6-7 días de fermentación.
5
- 10 2.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque en fermentación industrial se alcanza un nivel de producción de al menos 5.000 ppm de astaxantina a los 7-9 días de fermentación.
- 15 3.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por adicionar duroquinona durante el proceso de fermentación.
- 20 4.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque la duroquinona se adiciona a una concentración 25-50 μM .
- 25 5.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por adicionar retinal durante el proceso de fermentación.
- 30 6.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con la reivindicación 5, donde el retinal se adiciona a una concentración 35 μM .
- 7.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por adicionar ácidos trispóricos durante el proceso de fermentación.

8.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque los ácidos trispóricos se adicionan a una concentración de 50-100 µg/ml.

5

9.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por adicionar glutamato durante el proceso de fermentación.

10 10.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque el glutamato se adiciona a una concentración de 5,5 mg/ml.

11.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por utilizar para el proceso de fermentación el medio 5 descrito en la tabla I de la descripción.

12.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado por producir en matraz 4.490 ppm de astaxantina a los de 6-7 días de fermentación.

13.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por iluminar el caldo de fermentación durante el proceso de fermentación.

14.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado porque la fuente de iluminación utilizada es de luz blanca.

30

15.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado porque la fuente de iluminación utilizada es de luz ultravioleta.

16.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con la reivindicaciones 13 a 15, caracterizado por iluminar desde el inicio hasta el fin de la fermentación, preferentemente entre las 40 y 200 horas.

5

17.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con la reivindicación 16, caracterizado por utilizar ciclos de 6 horas de iluminación / oscuridad.

10 18.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, caracterizado por:

- (a) Sembrar inóculos de *X. dendrorhous*.
- (b) Cultivar los inóculos de *X. dendrorhous* durante 48 horas a 20°C.
- (c) Sembrar fases de cultivo primario de *X. dendrorhous* con alrededor del 0,4% (v/v) de la fase de inóculo.
- (d) Cultivar las fases primarias de *X. dendrorhous* durante 48-54 horas a 17-20°C.
- 15 (e) Sembrar cada fermentador con el 20% (v/v) de las fases primarias de *X. dendrorhous*.
- (f) Incubar la fermentación durante 60-72 horas a 18-20°C y los 5-7 días restantes a 17°C.

20 25 19.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con la reivindicación 18, caracterizado por producir al menos 425 mg/l de astaxantina a los 7-9 días.

30 20.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con las reivindicaciones 18 y 19, caracterizado por producir concentraciones de biomasa de al menos 50 gramos de peso seco de células por litro de caldo de fermentación.

21.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con la reivindicación 20, caracterizado por producir concentraciones de biomasa de al menos 80 gramos de peso seco de células por litro de caldo de fermentación.

5

22.- Procedimiento de fermentación de acuerdo con las reivindicaciones 18 a 21, caracterizado por producir al menos 5.000 µg de astaxantina por gramo de peso seco de células a los 7-9 días de fermentación.

10

23.- Biomasa de *X. dendrorhous* con valor nutritivo y pigmentante, obtenible por el proceso de fermentación descrito en las reivindicaciones 1 a 22, para su uso en alimentación humana y animal.

15

24.- Biomasa de acuerdo con la reivindicación 23, caracterizada por contener:

- a) Una concentración de al menos 5.000 µg/g astaxantina;
- b) Una concentración de al menos 7.400 µg/g de carotenoides totales;
- c) Una concentración de al menos el 15% de proteínas y
- d) Una concentración de al menos el 15% de hidratos de carbono.

20

25 25.- Compuestos para alimentación animal que consistan en o contengan la biomasa de las reivindicaciones 23 y 24.

30

26.- Compuestos para alimentación humana que consistan en o contengan la biomasa de las reivindicaciones 23 y 24.

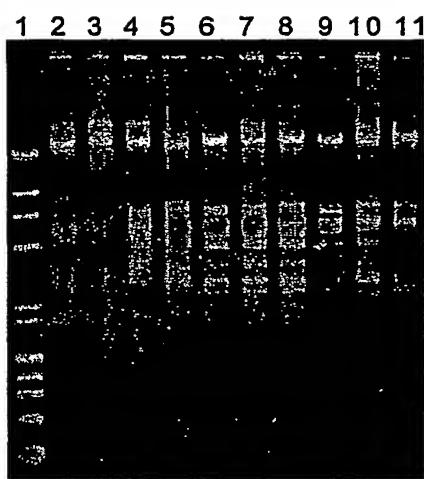


FIGURA 1

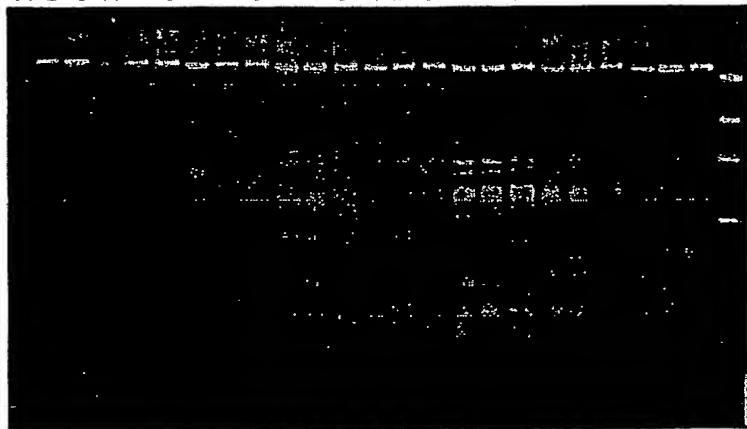


FIGURA 2

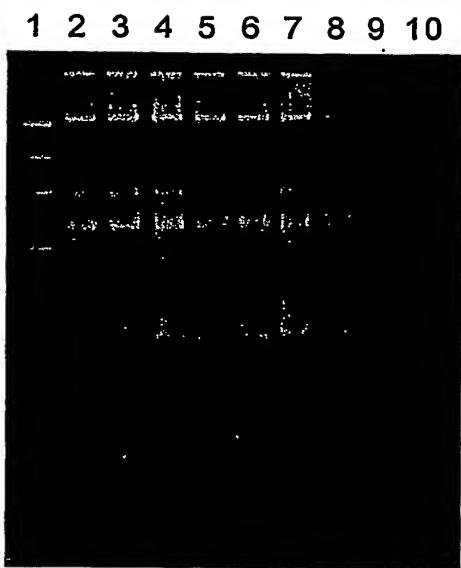
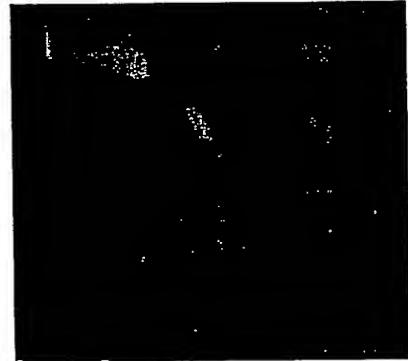


FIGURA 3

1 2



†
P
R
O
D
U
C
T
S
C
O
M
P
A
C
T
I
V
E

FIGURA 4

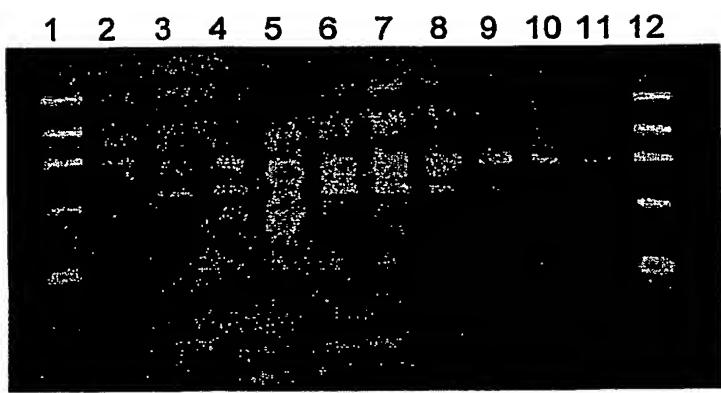


FIGURA 5

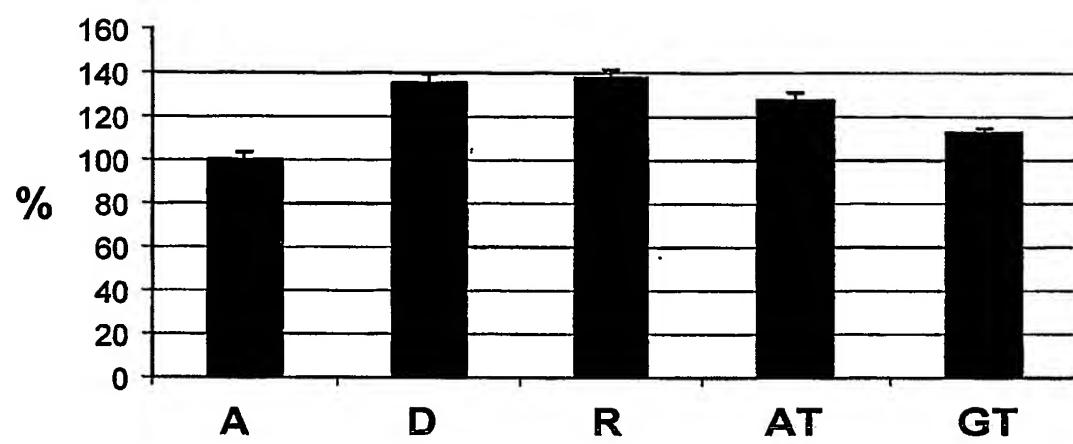


FIGURA 6

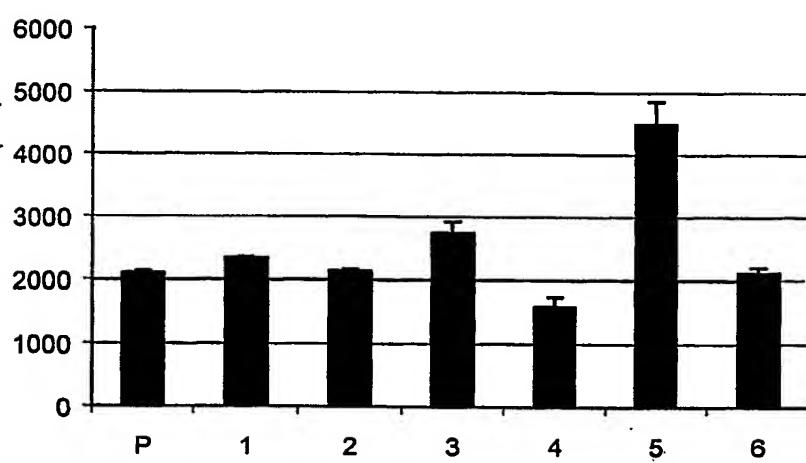


FIGURA 7

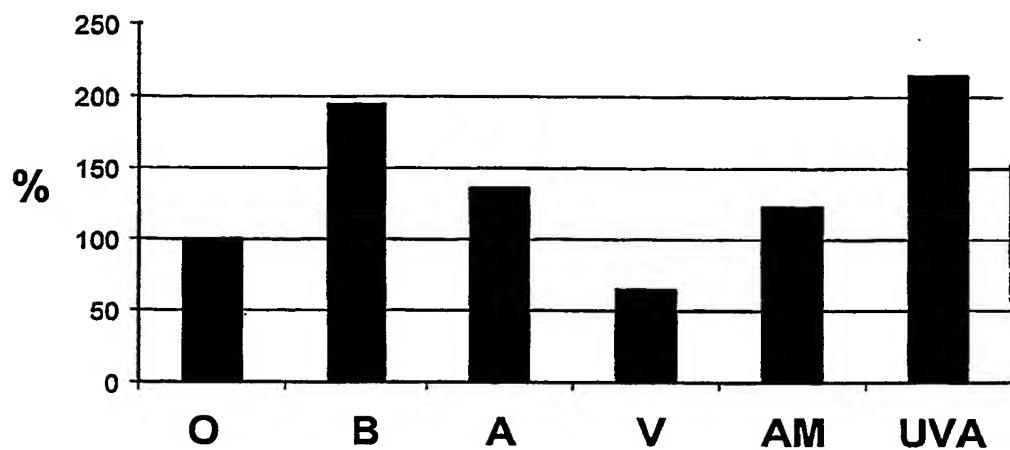


FIGURA 8A

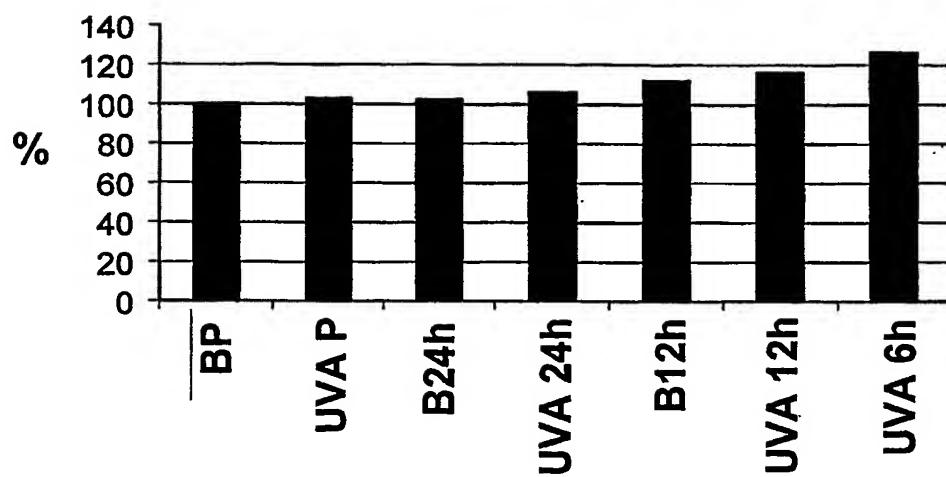


FIGURA 8B

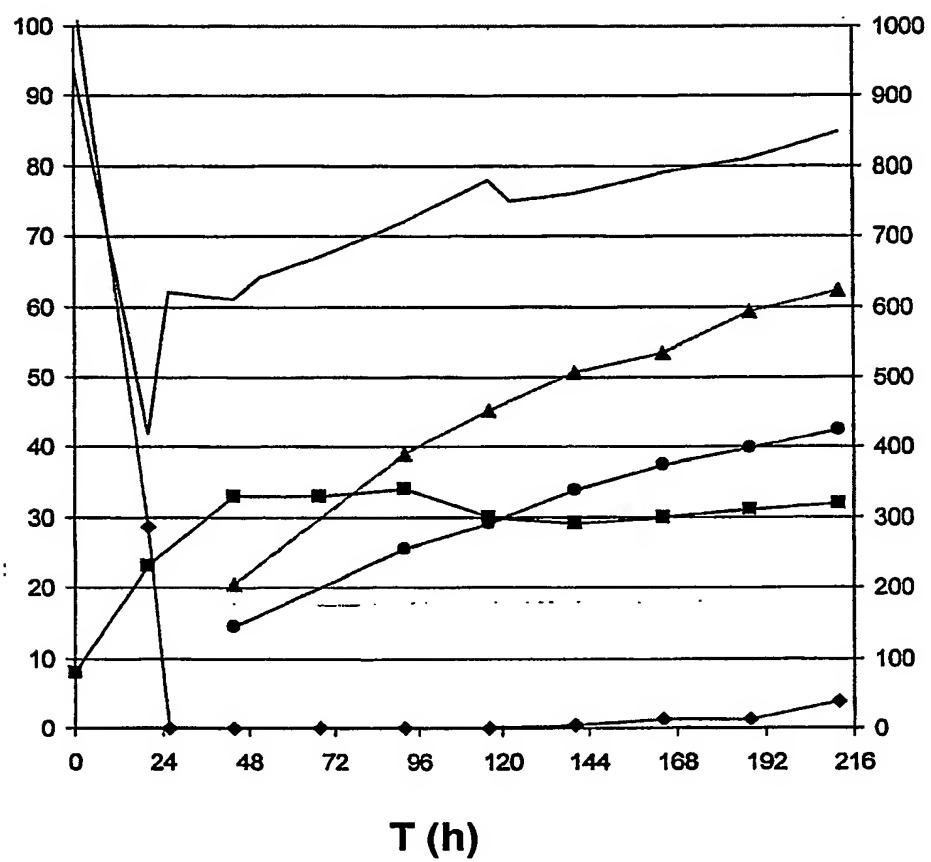


FIGURA 9

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.